(19)日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(II)特許出願公表番号 特表平8-511764

(43)公表日 平成8年(1996)12月10日

A 6 1 K 31/725 ABE 8314-4 C A 6 1 K 31/725 ABE C 0 8 B 37/10 7433-4 C C 0 8 B 37/10

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 27 頁)

(21)出願番号 特願平6-504708

(86) (22)出願日 平成5年(1993)7月23日 (85)翻訳文提出日 平成7年(1995)1月24日

(86)国際出願番号 PCT/US93/06933

(87) 国際公開番号 WO 9 4 / 0 2 1 0 7 (87) 国際公開日 平成 6 年 (1994) 2 月 3 日

(81)指定国 EP(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), AU, BR, CA, JP, K

R

(71)出願人 ケネディ,トーマス・ピー

アメリカ合衆国、バージニア 23294、リ ッチモンド、パーラム・ロード 7702 マ

クガイア・クリニック

(72)発明者 ケネディ,トーマス・ピー

アメリカ合衆国、バージニア 23294、リッチモンド、パーラム・ロード 7702 マ

クガイア・クリニック

(74)代理人 弁理士 山本 秀策

(54) 【発明の名称】 好中球エラスターゼ及びカテプシンGの阻害方法及び阻害薬

(57)【要約】

哺乳類における好中球エラスターゼ及びカテプシンGを阻害する方法及び薬剤であって、治療有効量の脱2-O-硫酸化ヘパリンをそれを必要としている哺乳類に投与することからなる方法及び薬剤である。本薬剤は好ましくはエーロゾル投与又は静脈内(IV)注射により投与される。本発明の詳細な実施熊様においては、エラスターゼに対する脱2-O-硫酸化ヘパリン比は、約0.2以上及び約2.0未満であり、カテプシンGに対する脱2-O-硫酸化ヘパリン比は約0.4以上及び約2.0未満である。脱2-O-硫酸化ヘパリン薬剤は好ましくは、生理学的に緩衝された食塩水、正常食塩水及び蒸留水からなる群より選ばれてもよい生理学的に許容される担体を含む。

【特許請求の範囲】

- 1. 哺乳類における好中球エラスターゼ及びカテプシン G 阻害のための薬剤であって、ヘパリンの $\alpha-L-d$ ズロン酸-2-d スルフェート糖単位の 2-d 一硫酸基をアルカリ加水分解により除去することによって調製される、治療有効量の非抗凝固性脱硫酸化ヘパリンからなる薬剤。
- 2.該薬物がエーロゾル投与により投与される請求の範囲第1項記載の薬剤。
- 3. 該薬物が静脈内(IV)注射により投与される請求の範囲第1項記載の薬剤
- 4. エラスターゼに対する脱2-O-硫酸化へパリン比が約0. 2以上及び約2. 0未満である請求の範囲第1項記載の薬剤。
- 5. カテプシンGに対する脱2-O-硫酸化ヘパリン比が約0. 4以上及び約2. 0未満である請求の範囲第1項記載の薬剤。
- 6. 生理学的に許容される担体を含む請求の範囲第1項記載の薬剤。
- 7. 該担体が、生理学的に緩衝された食塩水、正常食塩水及び蒸留水からなる群より選ばれる請求の範囲第6項記載の薬剤。
- 8. 哺乳類における好中球エラスターゼ及びカテプシンGを阻害する方法であって、請求の範囲第1項記載の治療有効量の脱2-O-硫酸化ヘパリンを哺乳類に投与することからなる方法。
- 9. 該治療有効量がエーロゾル投与により投与される請求の範囲第8項記載の方法。
- 10. 該治療有効量が静脈内(IV)注射により投与される請求の範

囲第8項記載の方法。

- 11. エラスターゼに対する脱2-O-硫酸化ヘパリン比が約0. 2以上及び約2. 0未満である請求の範囲第8項記載の方法。
- 12. カテプシンGに対する脱2-O-硫酸化へパリン比が約0. 4以上及び約2. 0未満である請求の範囲第8項記載の方法。
- 13. 該脱2-〇-硫酸化ヘパリンを生理学的に許容される担体と混合することを含む請求の範囲第8項記載の方法。

14. 該担体が、生理学的に緩衝された食塩水、正常食塩水及び蒸留水からなる群より選ばれる請求の範囲第13項記載の方法。

【発明の詳細な説明】

好中球エラスターゼ及びカテプシンGの阻害方法及び阻害薬

本発明は哺乳類の医学的治療に関し、より詳細には哺乳類の好中球エラスターゼ及びカテプシンGをコントロールする方法及びコントロールするための薬物に関する。

活性化された好中球は、ヒト及びそのほかの哺乳類における多数の疾患において、罹患器官へ移動した後に多数の酸化性化学物質及び酵素を放出することによって、重要な役割を果たす。スーパーオキシドアニオン、過酸化水素及び次亜塩素酸などの酸化剤は、それ自体有害であるが、活性化された好中球によって産生される主な破壊性成分はカチオン性プロテアーゼであり、その大部分はエラスターゼ及びカテプシンGからなる。好中球がこれらのプロテアーゼを放出すると、プロテアーゼが、 $\alpha-1$ 一抗プロテイナーゼなどの十分な細胞外抗プロテイナーゼによって中和されない限り、組織破壊が起きる。

遺伝による $\alpha-1$ — 抗プロテイナーゼの欠損を有する人は、治療不可能なタンパク質分解性肺疾患を生涯にわたって有し、最終的には肺気腫を発症する。喫煙は、活性化された白血球の肺への流入と、その後の顆粒の分解とプロテアーゼの放出をもたらす。喫煙によって生じる酸化剤は又、活性部位の近くの重要なメチオニンを酸化することによって、 $\alpha-1$ — 抗プロテイナーゼを不活性化する。喫煙により肺へ流入した結果、肺胞単位へ到達したエラスターゼは、 $\alpha-1$ — 抗プロテイナーゼの活性を酸化的に不活性化するとともに、プロテアーゼ/抗プロテイナーゼの活性を酸化的に不活性化するとともに、プロテアーゼ/抗プロテイナーゼ活性の不均衡を招き、これ

が喫煙によるヒトの肺気腫の主な原因であると考えられている。

気道内に不均衡が生じると、気道に慢性炎症が生じるので、好中球由来のエラスターゼ及びカテプシンGが、慢性気管支炎の病因として重要であると考えられている。肺脈管系内で不均衡が生じると、その結果生じる微小脈管系の傷害が、肺浮腫形成をもたらす。このようにして、活性化された白血球の流入並びにエラスターゼ及び他の好中球プロテアーゼの放出が、成人呼吸困難症候群における肺の傷害の主要原因となっている。好中球由来のエラスターゼは、嚢胞線維症、つ

まり高度に粘液膿性である気管支炎であって、ヒトにおけるどのような疾患におけるよりもエラスターゼ活性測定値が最大級のものであることを特徴とする疾患におけるタンパク質分解性肺破壊の主要原因でもある。

また、心筋梗塞及び心発作など、器官における血流量の突然の低下とその後の血流の回復によって起こされる疾患(虚血—再灌流性傷害)は、活性化された白血球がすでに傷害を受けている組織に速やかに侵入する際の再灌流期における組織破壊の拡大を特徴とする。虚血後に再灌流された器官に到達する好中球エラスターゼは、心筋、腸及びそのほかの組織の再灌流による傷害の病因において中枢的役割を果たしていることが証明されている。上記の過程におけるカテプシンGの役割は、詳しく検討されていないが、好中球中にはエラスターゼの2倍ものカテプシンGが存在しているため、カテプシンGも又同じく重要な役割を果たしていると考えられる。

エラスターゼ及びカテプシンGは、ヒトにおける様々な重大な疾患の仲介物質であるため、これらの酵素の有効な阻害物質を開発す

ることは、実験薬理学における実際的な目標である。しかし今日に至るまで、エラスターゼ及びカテプシンGの両方を有効かつ安全に阻害する物質は存在していない。エラスターゼの有機的阻害物質はわずかに開発されている(C.P. Sommerh off, et al., European Journal of Pharmacology (1991) 193:153-158)が、この物質はカテプシンGに対して活性を有することは証明されていない。2種類の生体分子、 $\alpha-1$ — 抗プロテイナーゼ阻害剤及び気管支分泌阻害剤は、好中球の酸化剤による不活性化を受けるため、好中球酸化剤とプロテアーゼとが同時に存在する生物学的環境においては、有効ではないと考えられる(D.C. Flenley, Quarterly Journal of Medicine (1986) 61:901-909;C. Vogelmeier, et al., Journal of Clinical Investigation (1991) 87:482-488)。エラスターゼ及びカテプシンGの両方に対しては同時に有効であり、タンパク質分解又は酸化による不活性化に対しては感受性を示さない阻害物質が求められている。硫酸化多糖類は、これらの望ましい特性のいずれをも有している。

ヘパリン及びそのほかの硫酸化多糖類が、ヒト多形核白血球由来のエラスター

ぜ及びカテプシンGの強力な非競合性阻害物質であることは、以前より報告されている(N.V. Rao, et al., A.M. Rev. Respir. Dis. (1990) 142:407-412; A. Baici, et al., Biochem. Pharmacol. (1980) 29:1723-1727; A. Baichi, et al., Biochem. Pharmacol. (1981) 30:703-708; K. Marossy, Biochim. Biophys. Acta, (1981) 659:351-361; A. Bacici, et al., Chem. Biol. Interactions (1984) 51:1-11; A. Lutini, et al.,

Biochem. Int. (1985) 10:221-232; F. Redini, et al., Biochem. J. (1988) 252:515-519; and F. Redini, et al., Biochem. Pharmacol. (1988) 37:4257-4261)。阻害の原理は、多糖類の負に荷電した硫酸基と、エラスターゼ又はカテプシンGなどの高度に塩基性である酵素の表面に位置するアルギニン残基の正に荷電したグアニジニウム基との間の静電結合の形成である。この相互作用は、酵素の活性中心に影響を及ぼさないが、エラスチン分解活性を間接的に失わせる

あらゆる硫酸化多糖類のうち、ヘパリンが、ヒトにおいて最も長く最も安全に使用されてきた歴史を有している。毒物学的見地からは、エアゾールによって肺に選択的に到達するとしても、ヘパリンが抗凝固剤であるとの事実はあるが、それでもヘパリンは、エラスターゼ及びカテプシンGの最も望ましい阻害物質である。多糖類の繰り返し配列が、血漿タンパク質であるアンチトロンビンIIIと特異的に結合し、血液凝固のカスケードに対するトロンビンのプロコアグラント効果をアンチトロンビンが阻害する速度を劇的に加速するので、ヘパリンが抗凝固剤として作用すると考えられている。市販のヘパリンのうちごく一部がアンチトロンビンIIIと結合するので、アンチトロンビンIIIーセファロースのアフィニティカラムにヘパリンを通過させることによって、抗凝固性分画が除去され、抗凝固活性の無い不完全に硫酸化された分画が残る。しかし、この方法を用いてヘパリンからその抗凝固活性を除去するのは、市販を目的とした実際的な規模で行うにはあまりに非効率的である。

従来の技術においては、ヒト多形核白血球エラスターゼ

(HLE) 及びカテプシン G の阻害物質としての多糖類の活性は、修飾されてい ない硫酸基の存在に直接依存している。硫酸デキストランは、強力なエラスター ゼ阻害物質であるが、硫酸化されていないデキストランはそうではない。さらに 又、入手可能な文献においては、多糖類を部分的に脱硫酸化することによっても 、HLE及びカテプシンGに対する阻害活性が失われるが、化学的に過剰に硫酸 化すると、阻害活性が増強されることが示唆されている。HNO2により化学的 に解重合し、ゲルろ過することによって得られるヘパリンの分画を用い、硫酸基 の重要性に関する研究が行われている (F. Redini, et al., Biochem. J., (198 8) 252:515-519)。この後半の工程によって得られる非修飾へパリン分画は、 強力なエラスターゼ阻害物質であったが、その強力な抗凝固力も保持していた。 分画を化学的に 0 一硫酸化することによって硫酸化の程度を増大させると、エラ スターゼ阻害物質としての力価も著しく上昇したが、分画の抗凝固活性はあまり 変動しなかった。一方、脱N-硫酸化し、さらにN-アセチル化(残存している 正荷電を保護し、分画の抗凝固活性を低下させる)することにより、ヒト白血球 エラスターゼ及びカテプシンGに対する阻害活性は完全に除去された。脱N-硫 酸化分固を化学的に過剰に〇一硫酸化すると、阻害活性が回復したばかりでなく 、硫酸化は同程度であるが、N-硫酸基を有する本来の物質に比べて、より大き な阻害力価を有する分画が得られた。阻害活性にとって重要なのは、硫酸化の程 度だけではなく、N-硫酸基の存在よりも、O-硫酸基の存在のほうがより重要 であることが示唆されている。しかし、これらの高度に有効な修飾へパ

リンは、強力な抗凝固活性を保持しているため、哺乳類での使用に適したものは なかった。

抗凝固剤としてのヘパリンを不活性化するための幾つかの化学的方法がある。 硫酸化の程度が、抗凝固活性の重要な決定因子であることが確立されているため 、化学的方法の多くは、化学的脱硫酸化の方法に基づいている。

ピリジニウムへパリン塩をジメチルスルホキシド(DMSO)の5%メタノール溶液により50%で1. 5時間処理することによってNー脱硫酸化し、DMSOの10%メタノール溶液により100%で18時間同様に処理することによっ

て全体的に脱硫酸化する方法が、ヘパリンから抗凝固活性を除去するために通常用いられている修飾法である。ヘパリンから抗凝固活性を除去するための別の方法は、55~60℃で72時間酸による加水分解を行い、部分的に脱N一硫酸化する方法である。しかし、すべての硫酸基を除去するか、又はN一硫酸基の除去により部分的に脱硫酸化を行うと、ヘパリン及びほかの硫酸化多糖類は、ヒトエラスターゼ及びカテプシンGの阻害物質としては非活性化されてしまう。従って、現在用いられているヘパリンの抗凝固活性を除去するための脱硫酸化法によって、エラスターゼ及びカテプシンGなどのカチオン性白血球プロテアーゼの阻害能も又破壊されてしまうことを、従来の技術は教示している。

従って、過剰な硫酸化により、抗凝固活性が保持されると共に、エラスターゼ 及びカテプシンGに対する活性も増大する一方、脱硫酸化により、抗凝固活性が 低下すると共に、エラスターゼ及びカテ

プシンGに対する活性も大きく減少することが従来の技術により証明されている。従来の技術からの予想に反し、本発明者は、 $\alpha-L-d$ ズロン酸-2-Zルフェートを選択的に脱2-O- 硫酸化することによって、修飾へパリンのエラスターゼ及びカテプシンG阻害物質としての活性が失なわれることなく、ヘパリンの抗凝固活性が除去されることを発見した。

本発明の目的は、哺乳類におけるエラスターゼ及びカテプシンGを阻害する方法を提供することである。

本発明の別の目的は、抗凝固活性を実質的に誘導しない治療薬にこのような阻害作用を導入することである。

本発明のさらに別の目的は、本治療薬のエーロゾル又は静脈内(IV)投与により、エラスターゼ及びカテプシンGを阻害する方法を提供することである。

本方法により、抗凝固活性を誘導せずにエラスターゼ及びカテプシンGを実質的に阻害する治療薬が提供されることは、本発明の利点である。

本治療薬が、毒物学的に特性付けられた化合物から得られることは、本発明の別の利点である。

以下の図及び実施例を含む明細書を考慮することによって、当業界における技

術者であれば、本発明の付加的目的及び利点を知ることができるであろう。

本発明は、哺乳類における好中球エラスターゼ及びカテプシンG阻害のための薬剤であって、ヘパリンの $\alpha-L-イズロン酸-2-スルフェート糖単位の2-0-硫酸基を除去することに$

よって調製される、治療有効量の脱硫酸化へパリンからなる薬剤を提供するものである。本発明の好ましい実施態様においては、本薬剤はエーロゾル又は静脈内(IV)注射によって投与される。本発明のほかの実施態様においては、エラスターゼに対する脱2-O-硫酸化へパリンの有効比率は、約0.2以上及び約2.0未満であるよう選択され、又はカテプシンGに対する脱2-O-硫酸化へパリンの有効比率は、約0.4以上及び約2.0未満であるよう選択される。本薬物は好ましくは、生理学的に緩衝された食塩水、正常食塩水及び蒸留水からなる群より選ばれてもよい生理学的に許容される担体を含む。

本発明はまた、哺乳類における好中球エラスターゼ及びカテプシンGを阻害する方法であって、治療有効量の脱2-O-硫酸化へパリンを哺乳類に投与することからなる方法を提供する。本発明の方法の好ましい実施態様においては、治療有効量を、エーロゾル又は静脈内(IV)注射によって投与する。本発明の別の実施態様においては、エラスターゼに対する脱2-O-硫酸化へパリンの有効比は、約0.2以上及び約2.0未満であり、又はカテプシンGに対する脱2-O-硫酸化へパリンの有効比率は、約0.4以上及び約2.0未満である。本薬物は好ましくは、生理学的に緩衝された食塩水、正常食塩水及び蒸留水からなる群より選ばれてもよい生理学的に許容される担体を含む。

以下に述べる詳細な説明を図面と共に参照することにより、本発明がよりわかりやすく説明されよう。

図 1 は、ヘパリンの 5 糖体結合配列における脱 2-O 一硫酸化 α

- L - イズロン酸の化学式を示し;

図2は、ヘパリンの5糖体結合配列における $\alpha-L-$ イズロン酸の2-O-位を脱硫酸化するための予想反応式を示し;

図3は、食塩水(コントロール)、ヒト白血球エラスターゼ(HLE)、HLEプラスへパリン、及びHLEプラス脱硫酸化へパリンの投与24時間後の気管支肺胞洗浄液中の多形核白血球(PMN)細胞の数のグラフを示し;

図4は、食塩水(コントロール)、HLE、HLEプラスへパリン、及びHL Eプラス脱硫酸化へパリンの投与24時間後の気管支肺胞洗浄液中のヘモグロビン含有量の測定値のグラフを示し;そして

図5は、食塩水(コントロール)、HLE、HLEプラスへパリン、及びHLEプラス脱硫酸化へパリンの投与24時間後の気管支肺胞洗浄液中のタンパク質濃度のグラフを示す。

図1に示す、ヘパリンの5糖体結合配列における $\alpha-L-7$ ズロン酸からの2-O- 硫酸基の除去は、初めてE.G.V. Percival, Quarterly Rev., (1949) 3:3 69-384により解明され、J.P.R. Turvey, Adv. Carabohydrate Chem., (1965), 20:183-218においてまとめられたようなアルカリ条件下における硫酸化炭水化物の化学反応によって起きる。2級ヒドロキシル基上の硫酸基は、硫酸基が除去される際のエポキシド中間体の形成に利用可能な、隣接したトランス位に遊離ヒドロキシル基があれば、アルカリによる加水分解を受ける。これは、図2に示されている。ヘパリンに関しては、この反応が、凍結乾燥の間にアルカリによる加水分解とともに起

こることが、最近報告されている。 (R. Rej, et al., Throm. Haemostas. (1989) 61:540; and M. Jaseja, et al., Can. J. Chem. (1989) 67:1449-1456.) 本発明によるこれらの操作の修正により、エラスターゼ及びカテプシンGには有効であるが、非処理へパリンが有する抗凝固特性を有さないへパリンが得られた

本発明に関しさらに理解を得るために、以下の実施例には、ある種のより詳細な説明を示した。

実施例Ⅰ

ヘパリンの部分的脱N-硫酸化

4%ブタ腸粘膜へパリン(Scientific Protein Laboratories,Waunakee,WI

)水溶液をカチオン交換樹脂カラム、Dowex 50W x 8X(H)に通過させることによって、ブタ腸粘膜へパリンをヘパリン酸に変換した。L. Levy et al., Proc. Soc. Exp. Biol. Med. (1962) 109:901-905及びE. Sache et al., Thromb. R es. (1989) 55:247-258によって報告されているように、ヘパリン酸溶液を標準的な化学的灌流装置に 55%で 72 時間保持し、約 70%のN - 硫酸塩を除去した。本溶液を 1R-400 樹脂(OH)に通過させて過剰の SO_4 を除去し、pHを 7.0 に調製し、凍結乾燥することによって、脱N - 硫酸化されたヘパリンを回収した。

実施例Ⅱ

部分的脱N-硫酸化ヘパリンのHLEとの相互作用

一定量のHLE(100pmol)を、実施例Iで得られた部分的 $\hat{H}N$ 一硫酸化へパリンと共に、ヘパリン量を増大させながら($10\sim50pmol$ 、I:E比率は $0.1\sim0.5$)、HEPES緩衝液

 $(0.125 \, \text{M}, 0.125 \, \text{%}$ トリトン-X-100、pH7.5) $500 \, \mu \, \text{I}$ 中、最終容量が $900 \, \mu \, \text{I}$ になるよう希釈し、 $25 \, \text{C}$ で $30 \, \text{分間保温}$ することによって、部分的脱 $\, \text{N}$ 一硫酸化 $\, \text{N}$ パリンによる $\, \text{HLE}\, \text{の阻害を測定した}$ 。 $\, 3 \, \text{nM} \, \, \text{N} \,$ 一 $\, \text{Suc} \, -\text{Ala} \, -\text{Ala} \, -\text{Val} \, -\text{NA}$ ($\, \text{Sigma Chemicals}$, $\, \text{St. Louis}$, $\, \text{MO}$,ジメチルスルホキシド $\, \text{[DMSO]} \,$ 中で調製) $\, 100 \, \mu \, \text{I} \, \text{を加え}$ 、 $\, \text{タンパク質分 解により放出される色原体である} \, 4 \, -\text{ニトロアニリンの吸光度を} \, 405 \, \text{nm}$ で測定することによって、残存している酵素の活性を測定した。阻害%は、阻害物質がない場合の酵素活性に基づいて算出した。

部分的脱N-硫酸化ヘパリン及びヘパリンとHLEとの相互作用の結果を、表Iに示す。

<u>表 I</u> <u>H L E 阻害パーセント</u>

基質	Н	NDH
阻害剤 *		
<u>I:E 比</u> 0.1:1	53	29
0.2:1	79	37
0.3:1	88	37
0.4:1	90	49
0.5:1	91	50

 $^{*}H = ^{N}U$; NDH = 実施例Iにより得られた部分的脱N - 硫酸化ヘパリン。

表 I に示すように、ヘパリンは I: E比0. 2以上の場合にヒト

白血球エラスターゼ(HLE)を有意に阻害した。反対に、実施例Iで得られた部分的脱N一硫酸化へパリンにおいては、I:E比0.5においてさえも、HLEの阻害能は大きく低下していた。従って、HLEの阻害剤としてのヘパリンの活性は、ヘパリンの抗凝固作用を除去するために通常用いられている本処理法による多糖類の部分的脱硫酸化によって、かなり低下した。これらの結果は、脱硫酸化によりHLE及びカテプシンGの阻害剤としてのヘパリンの活性が破壊されることを示唆した前述の従来の技術における記載と一致していた。

実施例III

ヘパリンの脱2-0-硫酸化

0.4%ブタ腸粘膜へパリン(Scientific Protein Laborato-ries, Waunakee , WI)水溶液($4\,\text{mg/ml}$)を $0.1\,\text{N}$ N a O H によりpH $13.0\,\text{に調整}$ し、 $4\,\text{O}$ m l づつ小分けして、凍結し、凍結乾燥した。生成物を水に再溶解し、アンバーライト I R $-120\,\text{プラス}$ (H) カチオン交換樹脂に通過させて過剰の水酸化ナトリウムを除去し、最終pHを $7.0\,\text{に調整}$ し、溶液を真空ろ過により $0.2\,\text{ミクロンのミリポアろ紙に通過させて、最終的な再凍結乾燥の前に無菌とした。$

より大量の脱2-O-硫酸化へパリンを市販用に調製するには、ブタ腸粘膜へパリン(Scientific Protein Laboratories, Waunakee, WI)のナトリウム塩水溶液(最高で5重量/体積%)にNaOHを加えてpH13.0に調製し、凍結乾燥を行う。過剰のNaOHを除去するために乾燥生成物を水溶液に再溶解し、3倍量

実施例IV

血液凝固に対する脱2-0-硫酸化ヘパリンの効果

実施例IIIにより得られた脱硫酸化へパリンの抗凝固能を、活性化された部分トロンボプラスチン時間(APPT)に対する効果をin vitroにおいて測定することによって検討した。患者におけるヘパリンの抗凝固作用を臨床的に監視するのに用いられる通常の方法で、試験を行った。試験には、0. 1及び1. 0 mg/m 1のヘパリン又は実施例IIIで得られた脱2-0-硫酸化ヘパリンをヒトの試験血清にin vitroで加えたものを用いた。

表Ⅱ

<u>コン l</u>	ロール	ヘパリン		脱 2 - 0 - <u>ヘパリン</u>	- 硫酸化 ————
濃度(mg/ml)	0	1.0	0.1	1.0	0.1
血餅形成まで の時間(秒)	35-45	>150	80	42	38

実施例IIIにより得られた脱2-0-硫酸化へパリンについては、ヘパリン及び実施例IIIにより得られた脱硫酸化ヘパリンの0.1 mg/ml血漿希釈液が、ラッセルクサリヘビ蛇毒により処理を行った血漿を利用したXa活性測定法における試験時間を延長し、Xa因子を阻害した。

表 III

<u>希</u>	釈	抗	X a 因 子 活	<u>性</u>
		コントロール血漿	ヘパリン	脱2-0-硫酸化 ヘパリン
1:	2		> 8分	42秒
1:	10		> 7分	33秒
1: 1	00		42秒	32秒
1:10	00	35秒	32秒	32秒
0				

へパリンとは反対に、実施例IIIにより得られた脱硫酸化へパリンは、APT T延長能をほとんど示さず、抗Xa因子活性もほとんど示さなかった。

従って、脱2-O-硫酸化ヘパリンは、非硫酸化ヘパリンと比較すると、はるかに低下した抗凝固活性を示した。

実施例V

脱2-0-硫酸化ヘパリンのHLE及びカテプシンGとの相互作用

一定量のHLE(100pmol)を、実施例IIIで得られた脱2-O-硫酸化へパリンと共に、ヘパリンの量を増大させながら(10 \sim 60pmol、I/E比率は 0.1 \sim 0.6)、HEPES緩衝液(0.125M、0.125%トリトンー X-100、pH7.5)500 μ 1中、最終容量が900 μ 1になるよう希釈し、25 ∞ で30分間保温することによって、脱2-O-硫酸化へパリンによる HLEの阻害を測定した。3 $\,$ MM N-Suc-Ala-Ala-Val-NA(Sigma Chemicals, St. Louis, MO, ジメチルスルホ

キシド [DMSO] 中で調製) 100μ lを加え、タンパク質分解により放出される色原体である 4-ニトロアニリンの吸光度を 405 mで測定することによって、残存している酵素の活性を測定した。阻害%は、阻害物質がない場合の酵素活性に基づいて算出した。

実施例Ⅲにより得られた脱2-0-硫酸化へパリンによるカテプシンGの阻

害は、基質が3mM Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA (Sigma Chemical、DMSO中)であった以外は、上記と同様に測定した。

また、B.C. Starcher, Anal. Biochem. (1976) 74:441-447に基づき、ウシ靭帯エラスチンを調製した。エラスチン純度は、アミノ酸分析により測定した。その分解は、P.J. Stone, et al., Methods Enzymol. (1982) 82:588-605に記載の方法に従って、 H-NaBH4により標識したエラスチンを使用して測定した。トリチウム標識を行った粉末エラスチンをホモゲナイズし、使用直前のpHが7.4のリン酸緩衝食塩水(PBS)中で洗浄して、取り込まれなかった放射活性化合物を除去した。一定量のヒト白血球エラスターゼ(HLE)(67pmol)を、脱2-O-硫酸化ペパリン(6.7~134pmol)と共に37℃で30分間、最終容量1.0mlのHEPES緩衝液(0.125M、0.125%トリトンーX-100、pH7.5)中で予備培養した。各反応液900μ1ずつを H-エラスチン5mg及び0.9%食塩水100μ1と共に37℃で培養した。溶解したペプチドを、中程度の多孔度を有するろ紙を用いてろ過し、エラスチン懸濁液から分離した。溶解した

3 Hペプチドを定量することによって、分解速度を測定した。

脱2-O-硫酸化ヘパリン及びヘパリンのHLE及びカテプシンGとの相互作用の結果を、表IVに示す。

<u>表 I V</u>

		<u>阻害ノ</u> HL	<u>(ーセン</u> E	<u> </u>	カテー	プシンG
基質°	1			3		
阻害剤。	Н	ODH	H	ODH	Н	ODH
<u>I:E比</u> 0.1:1	23	20	72	73	31	14
0.2:1	81	74	95	77	49	54
0.3:1	88	84	-	-	-	-
0.4:1	87	85	92	72	67	56
0.5:1	87	84	94	85	-	_
0.6:1	99	100	_	-	-	-
0.8:1	-	-	-	-	78	69
1.0:1	-	-	97	8 5	76	69
2.0:1	-	-	97	84	76	67

*A = N - S u c - A l a - A l a - V a l - N A; B = *H - エラスチン; C = S u c - A l a - A l a - P r o - P h e - p N A。

[◦]H=ヘパリン; ODH=実施例III により得られた脱2-O-硫酸化ヘパリン。

表IVに示したように、ヘパリン及び実施例IIIにより得られた脱2-〇-硫酸化ヘパリンの両方によって、基質に対する阻害剤の比率(I:E)が0.2以上である場合、ヒト白血球エラスターゼ(HLE)が有意に阻害され、I:E 比率が0.4以上である場合、カテプシンGもまた又有意に阻害される。この比率の範囲内ではいずれも、ヘパリン及び実施例IIIにより得られた脱2-〇-硫酸化ヘパリンにより有効な阻害が認められるが、両者の間にはごくわずかな差しか認められない。したがって、脱2-〇-硫酸化ヘパリンは、脱硫酸化されていない

へパリンとほぼ同一の阻害を示す。さらに脱2-O-硫酸化へパリンは、抗凝固活性をほとんど示さなかった。これは、非常に強力な抗凝固剤である非修飾へパリンとは反対である。実施例VI

In vivo (生体内試験) による検討

ヒト白血球エラスターゼ(HLE)により仲介される肺の障害に対する脱硫酸化ペパリンの予防能を、体重90~110gの雌性ゴールデンシリアンハムスター(Harlan Industries,Indianapolis,Indiana)を用いて調べた。フェノバルビタールにより麻酔を行ったハムスターの気管内に、無菌の0.9%食塩水(NS)0.25ml、HLE(100 μ g)含有NS 0.25ml、又はペパリン(Sigma)若しくは実施例IIIにより得られた脱2-O一硫酸化ペパリン500 μ gを含有するNS 0.25ml及びその後にHLE含有NS 0.25mlを注射した。処理の24時間後に動物を放血により屠殺した。喉を開き、肺を全体的に切開した。気管にポリエチレン管を挿入し、NS 3mlづつにより5回連

続して洗浄した。洗浄液を $200 \times G$ で10分間遠心分離した。得られた細胞ペレットをハンクス平衡食塩溶液(HBSS) 1 m1に再懸濁して細胞数の計測と同定を行った。上清については、急性障害の指標としてタンパク質とヘモグロビンの測定を行った。その結果を表Vに示す。

表V

No. de la Sula Sula Su	PMN ^a	総ヘモグロビン	タンパク質
	(X10 ⁶ セル)	(mg)	(mg/m1)
注射溶液 ^b			
コントロール	0.95	0.396	35.08
NS 0.5m1	(0.443)	(0.215)	(0.111)
HLE	16.3	8.15	100.69
(100 μ g)	(0.744)	(0.53)	(0.98)
HLE+H	10.83	0.867	41.06
(100 μ g+500 μ g)	(0.452)	(0.439)	(0.114)
HLE+0DH	9.83	1.5	65.80
(100 μ g +500 μ g)	(0.86)	(0.23)	(0.659)

^aPMN=多形核白血球

例IIIにより得られた脱2-O-硫酸化ヘパリン

ヘパリン及び実施例IIIにより得られた脱2-0-硫酸化ヘパリンは両方とも、in vivoにおいてエラスターゼにより誘発される障害の強力な阻害剤であった

実施例IIIにより得られた脱2-O-硫酸化へパリンについて、毒性試験を行った。エラスターゼ及びカテプシンGの阻害剤であ

る、硫酸デキストランなどその他の硫酸化多糖類を、ラットに対し0.5 mg/kg と低用量で気管支内に注射したところ、肺胞嚢に出血が起きた(肺胞出血)。実施例IIIにより得られた脱2-O-硫酸化ヘパリンを、ラットに10 mg/kgもの用量で気管支内投与したところ、肺胞出血は起きなかった。

実施例IIIにより得られたアルカリ加水分解へパリンは、肺気腫、慢性気管支炎、成人呼吸困難症候群(ARDS)及び嚢胞線維症などの呼吸器疾患の治療に、エーロゾルとして呼吸器系に直接投与することによって、使用することができる。無菌 0.9%食塩水 3 ml に溶解した用量約 10~約100 mgの脱2-0-硫

^bHLE=ヒト白血球エラスターゼ;H=ヘパリン;ODH=実施

酸化へパリンを、直径の中央値(メディアン)が10μ未満の粒子エーロゾルを 発生させる陽圧源(圧縮機又は圧縮空気若しくは酸素のいずれか)に取り付けた 通常臨床的に使用可能であるエーロゾル装置(デビルビス(Devilbiss)又はエ イコン(Acorn)ネブライザー)を用いて約6時間ごとに(又は1日当たり約4 回)肺内へエーロゾル投与する。

慢性気管支炎などの疾患には、更に低用量でも有効であろうが、呼吸器系分泌物中エラスターゼ濃度がはるかに高い嚢胞線維症には、より高用量が必要であろう。

心筋梗塞及び心発作などの虚血—再灌流疾患の治療には、脱2-O—硫酸化へパリンを持続的注入により静脈内注射(IV)する。脱2-O—硫酸化へパリン 0. 5 mg/kgを静脈内にボラス投与した後、2. 5 \sim 5. 0 mg/kgを5%デキストロース250 \sim 500 ml、0. 45%NaCl又は0. 9%NaClと混合し、24時間

かけて持続的に注入し、血管系内の血中薬物濃度を一定に保持する。

付加する請求の範囲には、各種の新規かつ有用な本発明の特徴を記載する。

【図1】

【図3】

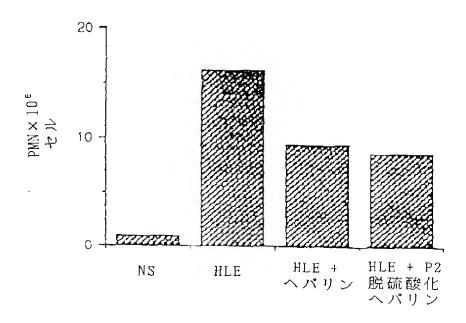
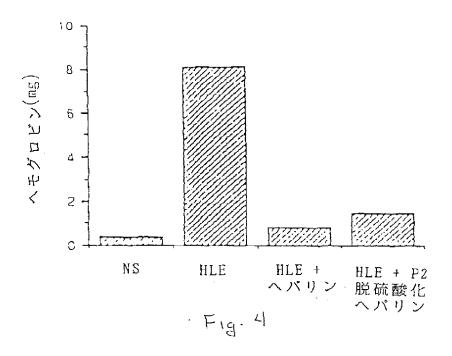


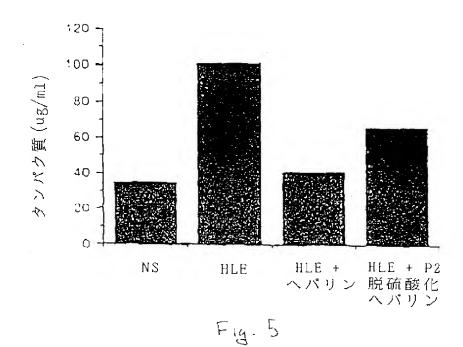
Fig. 3

[図2]

[図4]



【図5】



【手続補正書】特許法第184条の8

【提出日】1994年7月20日

【補正内容】

請求の範囲

- 1. 哺乳類における好中球エラスターゼ及びカテプシンGを阻害するために使用される薬剤の製造のための、ヘパリンの $\alpha-L-$ イズロン酸-2-スルフェート糖単位の2-O-硫酸基をアルカリ加水分解により除去することによって得ることができる非抗凝固性脱硫酸化ヘパリンの使用。
- 2. 薬剤をエーロゾル投与されるようにした請求の範囲第1項の使用。
- 3. 薬剤を静脈内注射により投与されるようにした請求の範囲第1項の使用。
- 4. 薬剤が、生理学的に緩衝された食塩水、正常食塩水及び蒸留水から選ばれる担体を含む先行するいずれかの請求の範囲の使用。

【国際調査報告】

A CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER TPC S AGENSIA/725 According to International Patient Classification (IPC) or to both associal distribution and IPC B. PIRLD SEARCHED Morrows of distribution searched (classification system followed by distributions system) Documentation searched other than monamism documentation to the excent that ruch documents are included in the fields searched Encroses data base committed during the international starth (same of data base and, where practical, search terms used) Encroses data base committed during the international starth (same of data base and, where practical, search terms used) Encroses data base committed during the international starth (same of data base and, where practical, search terms used) Encroses data base committed during the international starth (same of data base and, where practical, search terms used) Encroses data base committed during the international starth (same of data base and, where practical, search terms used) Encroses distance of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages Engage 2, line 19 - line 30 see page 4, line 7 - line 8 see claims 1,9 X BIOCHEMISTRY vol. 25, no. 18, 1986 pages 5322 - 28 'Chemically modified heparins as inhibitors of heparan sulfate specific endo-beta-glucuronidase of metastatic melanoma cells' see abstract see page 5327; table I see abstract see page 5327; left column, line 7 - line 15 E' carter document but guilded on or after the international sling date voltage of page date of the precision of other colleges of monamic of page date reference, the date and process of countries to date the column and a second or content to content to the page of an other page of an other page of an other page o		INTERNATIONAL SEARCE	H REPORT -		
According to International Patent Classification (IPC) or to both bascohal distinction and IPC According to International Patent Classification (IPC) or to both bascohal distinction and IPC According to International Patent Classification (IPC) or to both bascohal distinction and IPC According to International resembled (classification (IPC) or to both bascohal distinction and IPC According to International searched (classification (IPC) or to both bascohal distinction and IPC According to International searched (Classification or to IPC) According to International search (Classification or to IPC) According to IPC according to IPC (Classification or to IPC) According to IPC according to IPC (Classification or to IPC) According to IPC according to IPC (Classification or to IPC) According to IPC according to IPC (Classification or to IPC) According to IPC according to IPC (Classification or to IPC) A		AN DIMITION BEAUCI	T RELOKT	ntern. nal App	dication No
According to International Patient Classification (IPC) or to both national disantification and IPC ### PIRED SEARCHEED Documentation isserthed other than naturalized description of the control that noth documents are included in the fields reservined Pocumentation isserthed other than naturalized description of data base and, where principal, search forms used) Procedure of the data consisted datas the international starch (name of data base and, where principal, search forms used) Procedure of the document, with indication, where appropriate, of the referent passages				PCT/US 9	3/06933
According to Estemational Patent Classification (IPC) or to both baseousl classification and IPC 3. FISH_DS_SEARCHED Microsum denouncember in searched (dassification spittern followed by dassification peribod) IPC 5 AGIK Documentation is searched other than promising solutionnation to the extent that each documents are included in the Entitle searched Electronic data base completed damag the international startch (starte of data base and, where practical, waarch forms used) Electronic data base completed damag the international startch (starte of data base and, where practical, waarch forms used) E. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT Category Cluster of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages E. EP, A, D. 557 887 (OPOCRIN S.P.A.) 1 September 1993 See page 2, line 19 - line 30 see page 4, line 7 - line 8 see claims 1,9 X. BIOCHEMISTRY vol. 25, no. 18, 1986 pages 5322 - 28 'Chemically modified heparins as inhibitors of heparam sulfate specific endo-beta-glucuronidase of metastatic melanoma cells' see page 5327; table I see page 5327; table	A. CLASS	SIFICATION OF SUBJECT MATTER A61K31/725	"		
B. PHILD'S SEARCHED Minimum advancementation rearched (classification syntem (cliowed by dissification symbols) Documentation warched other than minimum documentation to the execute that note documents are included in the fields essential Electronic data base committed during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) Electronic data base committed during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) Electronic data base committed during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) E. CODCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT Category' Custom of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages E. P.A., D. 557 887 (OPOCRIN S.P.A.) 1 September 1993 See page 2, 1 inne 19 - 1 inne 30 See page 4, 1 inne 7 - 1 inne 8 See claims 1,9 X. BIOCHEMISTRY vol. 25, no. 18, 1986 pages 5322 - 28 'Chemically modified heparins as inhibitors of heparan sulfate specific endo-beta-glucuronidase of metastatic melanoma cells' see abstract see page 5327; table I see abstract see page 5327; table I see page 5327; table in an extraction of the seed of the search decided in the commission of box C. X. Putter documents are timed in the commission of box C. X. Putter documents are timed to an oral databoar, use, arbition or other special reason (in specifical) or other special reason (in specif		71017 720			<u> </u>
B. PHILD'S SEARCHED Minimum advancementation rearched (classification syntem (cliowed by dissification symbols) Documentation warched other than minimum documentation to the execute that note documents are included in the fields essential Electronic data base committed during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) Electronic data base committed during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) Electronic data base committed during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) E. CODCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT Category' Custom of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages E. P.A., D. 557 887 (OPOCRIN S.P.A.) 1 September 1993 See page 2, 1 inne 19 - 1 inne 30 See page 4, 1 inne 7 - 1 inne 8 See claims 1,9 X. BIOCHEMISTRY vol. 25, no. 18, 1986 pages 5322 - 28 'Chemically modified heparins as inhibitors of heparan sulfate specific endo-beta-glucuronidase of metastatic melanoma cells' see abstract see page 5327; table I see abstract see page 5327; table I see page 5327; table in an extraction of the seed of the search decided in the commission of box C. X. Putter documents are timed in the commission of box C. X. Putter documents are timed to an oral databoar, use, arbition or other special reason (in specifical) or other special reason (in specif					*
Documentation rearched (dismission system followed by dismissions symbols) Decimentation rearched other than naturalized described share in the content of the state and occurrents are included in the fields searched. Encourage data base committed during the invernational starch (name of data base and, where practical, search terms used) C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT Catagory ' Citation of documents, with indication, where appropriate, of the relevant passages E. EP, A, D. 557 887 (OPOCRIN S.P.A.) 1 September 1993 see page 2, line 19 - line 30 see page 4, line 7 - line 8 see Claims 1,9 X. BIOCHEMISTRY vol. 25, no. 18, 1986 pages 5322 - 28 'Chemically modified heparins as inhibitors of heparan sulfate specific endo-beta-glucuronidase of metastatic melanoma cells' see abstract. see page 5327; table I see page 60 parcelar reviews and the service of the search of the search of the service of the search of the s			fication and IPC	<u> </u>	
Documentation searched other than manimum documentation to the extent that noth documents are included in the fields essential Effective data base computed during the international starch (master of data base and, where practical, search terms used) C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT Category' Claims of documents, with indication, where appropriate, of the reformat passages E. EP, A, D. 557 887 (OPOCRIN S.P.A.) 1 September 1933 See page 2, line 19 - line 30 See page 2, line 19 - line 8 See claims 1,9 X. BIOCHEMISTRY vol. 25, no. 18, 1986 pages 5322 - 28 'Chemically modified heparins as inhibitors of heparan sulfate specific endo-beta-glucuronidase of metastatic melanoms cells' see abstract See page 5327; table I see page 5327; table I see page 5327; table I see page 5327, left column, line 7 - line 15 Y. Further documents are based in the communication of box C. X. Purchar documents are based in the communication of box C. X. Purchar documents are based in the communication of box C. X. Purchar documents are based in the communication of box C. X. Purchar documents are based in the communication of box C. X. Purchar documents are based in the communication of box C. X. Purchar documents are based in the communication of box C. X. Purchar documents are based in the communication of box C. X. Purchar documents are based in the communication of box C. X. Purchar documents are based in the communication of box C. X. Purchar documents are based in the communication of box C. X. Purchar documents published differ the international single date but before the substantion of the communication of the communication being defended to the communication of the communication being defended to the communication of the communication being defended to the communication being defended to the communication of the communication being defended to the communicati	i	<u> </u>			
Electronic data base consisted during the intermational tearch (name of data base and, where practical, search terms used) C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT Category ' Classon of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages E. P., A.O. 557. 887 (OPOCRIN S.P.A.) 1 September 1993 See page 2, 11ne 19 - 11ne 30 See page 3, 11ne 7 - 11ne 8 See claims 1,9 X. BIOCHEMISTRY vol. 25, no. 18, 1986 pages 5322 - 28 'Chemical 19 modified heparins as inhibitors of heparam sulfate specific endo-beta-quicuronidase of metastatic melanoma cells' see page 5327; table I column, line 7 - line 15 Further documents are listed in the continuation of box C. X. Petcot termity members are listed in annex. Y. Accommendate of citized document later of the six which is not considered to be of percental relevance in the continuational filing date. T. Indicated the continuation of the six which is not considered to be of percental relevance of the six members of the continuation of the six members of the continuation of the six members of the continuation of the continuation of the six members of the continuation of the continuation of the six members of the same patient family of the continuation band of the continuation band of the continuation of the same patient family of the continuation band of the same patient family and the continuation of the same patient family and the continuatio			ion symbols)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT Category' Glation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages E. E.P., A. D. 557 887 (OPOCRIN S.P.A.) 1 September 1993 see page 2, line 19 - line 30 see page 4, line 7 - line 8 see claims 1,9 X. BIOCHEMISTRY vol. 25, no. 18, 1986 pages 5322 - 28 'Chemically modified heparins as inhibitors of heparam sulfate specific endo-beta-glucuronidase of metastatic melanoma cells' see page 5327; table I see pag	Documenta	tion searched other than minimum documentation to the extent that s	nich documents are inclu	ded in the fields	searched
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT Category' Glation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages E. E.P., A. D. 557 887 (OPOCRIN S.P.A.) 1 September 1993 see page 2, line 19 - line 30 see page 4, line 7 - line 8 see claims 1,9 X. BIOCHEMISTRY vol. 25, no. 18, 1986 pages 5322 - 28 'Chemically modified heparins as inhibitors of heparam sulfate specific endo-beta-glucuronidase of metastatic melanoma cells' see page 5327; table I see pag					
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT Category' Glation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages E. E.P., A. D. 557 887 (OPOCRIN S.P.A.) 1 September 1993 see page 2, line 19 - line 30 see page 4, line 7 - line 8 see claims 1,9 X. BIOCHEMISTRY vol. 25, no. 18, 1986 pages 5322 - 28 'Chemically modified heparins as inhibitors of heparam sulfate specific endo-beta-glucuronidase of metastatic melanoma cells' see page 5327; table I see pag					
E EP,A,D 557 887 (OPOCRIN S.P.A.) 1 September 1993 see page 2, line 19 - line 30 see page 4, line 7 - line 8 see claims 1,9 X BIOCHEMISTRY vol. 25, no. 18, 1986 pages 5322 - 28 'Chemically modified heparins as inhibitors of heparan sulfate specific endo-beta-glucuronidase of metastatic melanoma cells' see bastract see page 5327; table I see page 5327; table I see page 5327, left column, line 7 - line 15 Y Further documents are based in the continuation of box C. Special categories of died document: -/ X Patent tently members are listed in annex. To document the grammal state of the srt which is not considered to be of pericular relevance to machine the continuation batt golvenor box machine the protocyted to involve an aneventive step when the considered to incoher the continuation beat golvenor in defining the protocyted to demand the protocyted to involve an aneventive step when the continuation beat golvenor in the continuation of the received to the continuation beat golvenor to period to the continuation beat golvenor to period the same above to considered to involve an aneventive step when the continuation beat golvenor to period the same above to considered to involve an aneventive step when the continuation beat golvenor to period the same above to considered to involve an aneventive step when the continuation beat golvenor to period the same above to considered to involve an aneventive step when the continuation beat golvenor to period the same patent family Date of the actual completion of the international search 24 March 1994 Name and creation of the same patent family Date of the actual completion of the international search 24 March 1994 Name and creating above or the ISA European Patent State State The same patent family Date of the actual completion of the international search 25 Capiti D	Electronic	data base consulted during the international search (name of data base	e and, where practical, se	arch terms used)	
E EP,A,D 557 887 (OPOCRIN S.P.A.) 1 September 1993 see page 2, line 19 - line 30 see page 4, line 7 - line 8 see claims 1,9 X BIOCHEMISTRY vol. 25, no. 18, 1986 pages 5322 - 28 'Chemically modified heparins as inhibitors of heparan sulfate specific endo-beta-glucuronidase of metastatic melanoma cells' see bastract see page 5327; table I see page 5327; table I see page 5327, left column, line 7 - line 15 Y Further documents are based in the continuation of box C. Special categories of died document: -/ X Patent tently members are listed in annex. To document the grammal state of the srt which is not considered to be of pericular relevance to machine the continuation batt golvenor box machine the protocyted to involve an aneventive step when the considered to incoher the continuation beat golvenor in defining the protocyted to demand the protocyted to involve an aneventive step when the continuation beat golvenor in the continuation of the received to the continuation beat golvenor to period to the continuation beat golvenor to period the same above to considered to involve an aneventive step when the continuation beat golvenor to period the same above to considered to involve an aneventive step when the continuation beat golvenor to period the same above to considered to involve an aneventive step when the continuation beat golvenor to period the same above to considered to involve an aneventive step when the continuation beat golvenor to period the same patent family Date of the actual completion of the international search 24 March 1994 Name and creation of the same patent family Date of the actual completion of the international search 24 March 1994 Name and creating above or the ISA European Patent State State The same patent family Date of the actual completion of the international search 25 Capiti D					
E EP,A,D 557 887 (OPOCRIN S.P.A.) 1 September 1993 see page 2, line 19 - line 30 see page 4, line 7 - line 8 see claims 1,9 X BIOCHEMISTRY vol. 25, no. 18, 1986 pages 5322 - 28 'Chemically modified heparins as inhibitors of heparan sulfate specific endo-beta-glucuronidase of metastatic melanoma cells' see bastract see page 5327; table I see page 5327; table I see page 5327, left column, line 7 - line 15 Y Further documents are based in the continuation of box C. Special categories of died document: -/ X Patent tently members are listed in annex. To document the grammal state of the srt which is not considered to be of pericular relevance to machine the continuation batt golvenor box machine the protocyted to involve an aneventive step when the considered to incoher the continuation beat golvenor in defining the protocyted to demand the protocyted to involve an aneventive step when the continuation beat golvenor in the continuation of the received to the continuation beat golvenor to period to the continuation beat golvenor to period the same above to considered to involve an aneventive step when the continuation beat golvenor to period the same above to considered to involve an aneventive step when the continuation beat golvenor to period the same above to considered to involve an aneventive step when the continuation beat golvenor to period the same above to considered to involve an aneventive step when the continuation beat golvenor to period the same patent family Date of the actual completion of the international search 24 March 1994 Name and creation of the same patent family Date of the actual completion of the international search 24 March 1994 Name and creating above or the ISA European Patent State State The same patent family Date of the actual completion of the international search 25 Capiti D					
E EP,A,D 557 887 (OPOCRIN S.P.A.) 1 September 1993 see page 2, line 19 - line 30 see page 4, line 7 - line 8 see claims 1,9 X BIOCHEMISTRY vol. 25, no. 18, 1986 pages 5322 - 28 'Chemically modified heparins as inhibitors of heparan sulfate specific endo-beta-glucuronidase of metastatic melanoma cells' see bastract see page 5327; table I see page 5327; table I see page 5327, left column, line 7 - line 15 Y Further documents are based in the continuation of box C. Special categories of died document: -/ X Patent tently members are listed in annex. To document the grammal state of the srt which is not considered to be of pericular relevance to machine the continuation batt golvenor box machine the protocyted to involve an aneventive step when the considered to incoher the continuation beat golvenor in defining the protocyted to demand the protocyted to involve an aneventive step when the continuation beat golvenor in the continuation of the received to the continuation beat golvenor to period to the continuation beat golvenor to period the same above to considered to involve an aneventive step when the continuation beat golvenor to period the same above to considered to involve an aneventive step when the continuation beat golvenor to period the same above to considered to involve an aneventive step when the continuation beat golvenor to period the same above to considered to involve an aneventive step when the continuation beat golvenor to period the same patent family Date of the actual completion of the international search 24 March 1994 Name and creation of the same patent family Date of the actual completion of the international search 24 March 1994 Name and creating above or the ISA European Patent State State The same patent family Date of the actual completion of the international search 25 Capiti D					
E EP,A,O 557 887 (OPOCRIN S.P.A.) 1 September 1993 see page 2, line 19 - line 30 see page 4, line 7 - line 8 see claims 1,9 X BIOCHEMISTRY vol. 25, no. 18, 1986 pages 5322 - 28 'Chemically modified heparins as inhibitors of heparan sulfate specific endo-beta-glucuronidase of metastatic melanoma cells' see abstract see page 5327; table I see abstract see page 5327; table I see page 5327; table I see page 5327, left column, line 7 - line 15 Value Value					Delayant to plains bla
September 1993 see page 2, line 19 - line 30 see page 4, line 7 - line 8 see claims 1,9 X BIOCHEMISTRY vol. 25, no. 18, 1986 pages 5322 - 28 'Chemically modified heparins as inhibitors of heparan sulfate specific endo-beta-glucuronidase of metastatic melanoma cells' see abstract see page 5327; table I see page 5327; table I see page 5327, left column, line 7 - line 15 X Further documents are listed in the continuation of box C. X Petent lating members are listed in annex. Y Petent lating members are listed in annex. To late document published after the international filing date or priority date and not in condition that cited to enable the or or more continuent but published on or after the international filing date 'A document which may throw doubts on priority claim() or which is cited to enablished prior or other special reason (as specified) To document which may throw doubts on priority claim() or which is cited to enablished prior to the international filing date to a condition or other special reason (as specified) To document which may throw doubts on priority claim() or which is cited to enablished prior to the international filing date to priority date and not in condition which is decided to make the published on or after the international involves on invention to priority date and not in condition which is cited to understand the priority of decidence in the published prior to the international filing date than the priority date claim of the continuent of the special reason (as specified) To document which may throw doubts on priority claim() or which is cited to enablished prior to the international search To document in priority date claimed invention cannot be considered to involve sing when the document is conditioned with one or more other stock document is staken alone to continue the condition or other staken and the condition or the common of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an amentive tip when the document is conditioned with one or more	Category	Custon of document, with indication, where appropriate, of the re-	ievani pasages		Resevant to cagain No.
September 1993 see page 2, line 19 - line 30 see page 4, line 7 - line 8 see claims 1,9 X BIOCHEMISTRY vol. 25, no. 18, 1986 pages 5322 - 28 'Chemically modified heparins as inhibitors of heparan sulfate specific endo-beta-glucuronidase of metastatic melanoma cells' see abstract see page 5327; table I see page 5327; table I see page 5327, left column, line 7 - line 15 X Further documents are listed in the continuation of box C. X Petent lating members are listed in annex. Y Petent lating members are listed in annex. To late document published after the international filing date or priority date and not in condition that cited to enable the or or more continuent but published on or after the international filing date 'A document which may throw doubts on priority claim() or which is cited to enablished prior or other special reason (as specified) To document which may throw doubts on priority claim() or which is cited to enablished prior to the international filing date to a condition or other special reason (as specified) To document which may throw doubts on priority claim() or which is cited to enablished prior to the international filing date to priority date and not in condition which is decided to make the published on or after the international involves on invention to priority date and not in condition which is cited to understand the priority of decidence in the published prior to the international filing date than the priority date claim of the continuent of the special reason (as specified) To document which may throw doubts on priority claim() or which is cited to enablished prior to the international search To document in priority date claimed invention cannot be considered to involve sing when the document is conditioned with one or more other stock document is staken alone to continue the condition or other staken and the condition or the common of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an amentive tip when the document is conditioned with one or more	F	FP & 0 557 887 (OPOCRIN S D &) 1			1-14
See page 4, line 7 - line 8 see claims 1,9 ### BIOCHEMISTRY vol. 25, no. 18, 1986 pages 5322 - 28 'Chemically modified heparins as inhibitors of heparam sulfate specific endo-beta-glucuronidase of metastatic melanoma cells' see abstract see page 5327; table I see page 5327; table I see page 5327, left column, line 7 - line ###################################	_				1 17
See Claims 1,9					
BIOCHEMISTRY vol. 25, no. 18, 1986 pages 5322 - 28 'Chemically modified heparins as inhibitors of heparan sulfate specific endo-beta-glucuronidase of metastatic melanoma cells' see abstract see page 5327; table I see page 5327; table I see page 5327, left column, line 7 - line 15 Patent family members are listed in snncx.					
vol. 25, no. 18, 1986 pages 5322 - 28 'Chemically modified heparins as inhibitors of heparan sulfate specific endo-beta-glucuronidase of metastatic melanoma cells' see abstract see page 5327; table I see page 5327; table I see page 5327, left column, line 7 - line 15 Value Petot lamily members are listed in annex.					
Pages 5322 - 28 'Chemically modified heparins as inhibitors of heparan sulfate specific endo-beta-glucuronidase of metastatic melanoma cells' see abstract see page 5327; table I see page 5327; table I see page 5327, left column, line 7 - line 15 Special categories of cited documents: A' document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevances: E' earlier document which may throw doubts on priority claims(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) O' document which may throw doubts on priority claims(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) O' document which may throw doubts on priority claims(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) O' document which may throw doubts on priority claims(s) or which is cited to establish the publication date of another other states alone the priority date claimsed. O' document which may throw doubts on priority claims(s) or which is cited to establish the publication date of another other states alone the priority date claimsed. O' document which may throw doubts on priority claims(s) or which is not considered to involve an inventive step when the document is taken alone the considered to involve an inventive step when the document is taken alone to involve an inventive step when the document is taken alone to involve an inventive step when the document is taken alone to involve an inventive step when the document is taken alone to involve an inventive step when the document is taken alone to involve an inventive step when the document is taken alone to involve an inventive step when the document is taken alone to involve an inventive step when the document is taken alone to involve an inventive step when the document is taken alone to involve an inventive step when the document is taken alone to involve an i	X				1~7
Chemically modified heparins as inhibitors of heparan sulfate specific endo-beta-glucuronidase of metastatic melanoma cells' see abstract see page 5327; table I see page 5327; table I see page 5327, left column, line 7 - line 15					
inhibitors of heparan sulfate specific endo-beta-glucuronidase of metastatic melanoma cells' see abstract see page 5327; table I see page 5327, left column, line 7 - line 15 -/ X Further documents are listed in the communation of box C. X Patent family members are listed in annex. Y					
melanoma cells' see abstract see page 5327; table I see page 5327, left column, line 7 - line 15 Further documents are listed in the commusation of box C.		inhibitors of heparam sulfate spe			
See abstract see page 5327; table I			atic		
See page 5327; table I see page 5327, left column, line 7 - line -/ X Further documents are listed in the continuation of box C. X Patent lamily members are listed in annex. X Further documents are listed in the continuation of box C. X Patent lamily members are listed in annex. X decument published after the international filing date or provity date and not in conflict with the application but cited to unstrained in the international filing date or provity date and not in conflict with the application but cited to unstrained and in conflict with the application but cited to unstrained invention in conflict with the application but cited to unstrained invention cannot be considered to involve an inventive step when the document of particular relevance; the daimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document of particular relevance; the daimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document of particular relevance; the dai					,
X Further documents are listed in the continuation of box C. X Pstent family members are listed in annex.					
Further documents are listed in the continuation of box C. X Pstent family members are listed in annex. Y Pstent family members are listed in annex. Y			7 - line		ĺ
Further documents are listed in the continuation of box C. X Patent family members are listed in annex. The document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance: The document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citablion or other resears. The document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other resears. The document published prior to the international filing date but lister than the priority date claimed. The document published prior to the international filing date but lister than the priority date claimed. The document published prior to the international filing date but lister than the priority date claimed. The document published prior to the international filing date but lister than the priority date claimed. The document published prior to the international filing date but lister than the priority date claimed. The document published prior to the international filing date but lister than the priority date claimed. The document published prior to the international filing date but lister than the priority date claimed. The document published after the international filing date invention cannot be considered to fixer along the invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is cutted to involve an inventive step when the document is cutted to involve an inventive step when the document is cutted to involve an inventive step when the document is cutted to involve an inventive step when the document is cutted to involve an inventive step when the document is cutted to involve an inventive step when the document is cutted to involve an inventive step when the document is cutted to involve an inventive step when the document is cutted to involve an inventive step when the document is cutted to involve an inventive step when the document is cutted to involve an inventive step when the document is cutted to involve an inventive step when the	_	15			
Special categories of cited documents: A' document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance to document but published on or after the international filing date E' earlier document but published on or after the international filing date L' document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) C' document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means P' document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed Date of the actual completion of the international search 24 March 1994 Name and mailing address of the ISA European Patent Office. P.B. 5818 Patentiaan 2 NL - 2280 HV Rigority T' later document published after the international filing date or priority date and not in condict with the application but condicts with the application but condicts with the application but considered to eventure; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone with one or more other such documents, such combination being obvious to a person shilled in the art. A' document member of the same patent family Date of mailing of the international search report 13. 04, 94 Authorized officer Authorized officer	•	-,	/		
Special categories of cited documents: A' document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance to document but published on or after the international filing date E' earlier document but published on or after the international filing date L' document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) C' document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means P' document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed Date of the actual completion of the international search 24 March 1994 Name and mailing address of the ISA European Patent Office. P.B. 5818 Patentiaan 2 NL - 2280 HV Rigority T' later document published after the international filing date or priority date and not in condict with the application but condicts with the application but condicts with the application but considered to eventure; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone with one or more other such documents, such combination being obvious to a person shilled in the art. A' document member of the same patent family Date of mailing of the international search report 13. 04, 94 Authorized officer Authorized officer					
'A' document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance E' earlier document but published on or after the international filing date L' document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) C' document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means P' document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed Date of the actual completion of the international search Date of the actual completion of the international search Date of mailing address of the ISA European Patent Office. P.B. 5818 Patentiaan 2 NL - 2280 HV Rigorija T' later document published after the international filing date international filing date international filing date invention cannot be considered to involve unit invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such document is combined with one or more other such document is to ombined with one or more other such document is to ombined with one or more other such document is the art. 'A' document member of the same patent family Date of mailing of the international search report 1 3. 04, 94 Authorized officer	X Furt	ner documents are listed in the continuation of box C.	χ Patent family me	mbers are listed :	n annex.
considered to be of particular relevance to the origing date. 'I.' document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) 'O' document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means 'P' document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed Date of the actual completion of the international search Date of the actual completion of the international search Date of mailing of the international search Date of mailing of the international search report 13. 04. 94 Authorized officer Authorized officer	* Special cat	agones of cited documents :			
'E' earlier document but published on or after the international filing date 'X' document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) 'O' document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means 'P' document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed Date of the actual completion of the international search 24 March 1994 Name and mailing address of the ISA European Patent Office. P.B. 5818 Patentiaan 2 NI 2280 HV Rigorijk Td. (+31-70) 34-0240, Tx. 31 651 epo nl.	"A" docume conside	ent defining the general state of the art which is not ered to be of particular relevance	cited to understand th		
"I." document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) O' document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means P' document published prior to the international fiting date but later than the priority date claimed Date of the actual completion of the international search Date of mailing of the international search Date of mailing of the international search Date of mailing address of the ISA European Patent Office. P.B. 5818 Patentiaan 2 NI 2280 HV Rigorija Td. (+31-70) 34-02040, Tx. 21 651 epo nl.	"E" earlier o	document but published on or after the international	K' document of particula	u relevance; the	dained invention
calculation or other special reason (as specified) O' document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means P' document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed Date of the actual completion of the international search Date of mailing of the international search Date of mailing of the international search Date of mailing of the international search file of mailing of the international search report 24 March 1994 Name and mailing address of the ISA European Patent Office. P.B. 5818 Patentiaan 2 NI 2280 HV Rigorija Td. (+31-70) 34-0240, Tx. 31 651 epo nl.	"L" docume	at which may throw doubts on priority claim(s) or	involve an inventive :	step when the do	cument is taken alone
other means P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed Date of the actual completion of the international search Date of mailing of the international search Date of mailing of the international search report 24 March 1994 Name and mailing address of the ISA European Patent Office. P.B. 5818 Patentiaan 2 NL - 2280 HV Rugwig Td. (+31-70) 34-2040, Tx. 31 651 epo nl,	citation	or other special reason (as specified)	cannot be considered	to involve un in	ventive step when the
Later than the priority data claimed A document member of the same patent family Date of the actual completion of the international search Date of mailing of the international search report 24 March 1994 Name and mailing address of the ISA European Patent Office. P.B. 5818 Patentiaan 2 NI 2280 HV Rigorija Td. (+31-70) 34-2040, Tx. 31 651 spo ni,	other n	OCATOS	ments, such combine		
24 March 1994 Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentiaan 2 NL - 2280 HV Rajevejk Td. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 spo ml,		an the priority date claimed		the same patent	family
Name and mailing address of the ISA European Paten; Office, P.B. 5818 Patentiaan 2 NL - 2280 HV Ruswijk Td. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,	Date of the	actual completion of the international search	Date of mailing of the	international se	arch report
European Patent Office. P.B. 5818 Patentiaan 2 NL - 2280 HV Superijk Td. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,	24	4 March 1994		13.04,9	4
NL - 22\$0 HV \$u;evijk Td. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,	Name and o	nailing address of the ISA	Authorized officer		
		NL - 2280 HV Rijewijk			
			Gerli, P		

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern at Application No
PCT/US 93/06933

PCT/US 93/06933				
(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT altegory * Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages Relevant to claim No.				
-8-3				
AM.REV.RESP.DIS. vol. 142 , 1990 pages 407 - 12 'Sulfated polysaccharides prevent human leukocyte elastase-induced acute lung injury and emphysema in hamsters' cited in the application see page 409 see page 411, right column, line 8 - line 26	1-14			
BIOCHEMJ. vol. 252 , 1988 pages 515 - 19 'Inhibtion of leukocyte elastase by heparin and its derivatives'	1-14			
EP.A.O 208 623 (SANOFI) 14 January 1987 see page 12, line 19 - line 22 see page 9, line 24 - line 27	1-14			

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT	PCT/US 93/06933
Box I Observations where certain claims were found unsearchab	ic (Continuation of item 1 of first sheet)
This international search report has not been established in respect of cert	ain claims under Article 17(2)(2) for the following reasons:
X Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched REMARK: Although claims 8-14 are direct	
gnostic method practised on) the human, ried out and based on the alleged effe	/animal body the search has been car- cts of the compound/composition.
Claims Nos.: because they relate to parts of the international application that an excent that no meaningful international search can be carried.	do not comply with the prescribed requirements to such out, specifically:
Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in according to the second of the seco	unce with the second and third sentences of Rule 6.4(a).
Box II Observations where unity of invention is lacking (Continue	ation of item 2 of first sheet)
This International Searching Authority found multiple inventions in this i	nternational application, as follows:
As all required additional search fees were timely paid by the appropriate searchable claims.	plicant, this international search report covers all
As all searchable claims could be searches without effort justifyi of any additional fee.	ng an additional fee, this Authority did not invite payment
As only some of the required additional search fees were timely covers only those claims for which fees were paid, specifically cl	paid by the applicant, this international search report aims Nos.:
No required additional search fees were timely paid by the appli restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered to the invention of the control of the cont	cant. Consequently, this international search report is vered by claims Nos.:
Remark on Protest The addition	nal search fees were accompanied by the applicant's protest.
No protest	accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Interns d Application No PCT/US 93(06933

			PC1/US	93/06933
Patent document cited in search report	Publication date	Patent mem	family ber(s)	Publication date
EP-A-0557887	01-09-93	NONE		
EP-A-0208623	14-01-87	FR-A- JP-A-	2584606 62018401	16-01-87 27-01-87
		·		